

(19) 【発行国】 日本国特許庁 (JP)

(19) [Publication Office] Japanese Patent Office (JP)

(12) 【公報種別】 公開特許公報 (A)

(12) [Kind of Document] Japan Unexamined Patent Publication (A)

(11) 【公開番号】 特開平 6 - 2 9 3 6 4 5

(11) [Publication Number of Unexamined Application] Japan Unexamined Patent Publication Hei 6 - 293645

(43) 【公開日】 平成 6 年 ( 1 9 9 4 ) 1 0 月 2 1 日

(43) [Publication Date of Unexamined Application] 1994 (1994) October 21 day

(54) 【発明の名称】 逆転写酵素阻害剤

(54) [Title of Invention] REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITOR

(51) 【国際特許分類第 5 版】

(51) [International Patent Classification 5th Edition]

A61K 31/70 ADY 8314-4C

A61K 31/70 ADY 8314-4C

// C07H 19/10

// C07H 19/10

19/20

19/20

C12N 9/99

C12N 9/99

【審査請求】 未請求

[Request for Examination] Examination not requested

【請求項の数】 2

[Number of Claims] 2

【出願形態】 OL

[Form of Application] OL

【全頁数】 5

[Number of Pages in Document] 5

(21) 【出願番号】 特願平 5 - 8 3 3 9 1

(21) [Application Number] Japan Patent Application Hei 5 - 83391

(22) 【出願日】 平成 5 年 ( 1 9 9 3 ) 4 月 9 日

(22) [Application Date] 1993 (1993) April 9 day

(71) 【出願人】

(71) [Applicant]

【識別番号】 5 9 3 0 7 0 1 4 7

[Applicant Code] 593070147

【氏名又は名称】 実吉 峯郎

[Name] TSUKASA SANEYOSHI MINE

【住所又は居所】 東京都八王子市散田町 1 - 7 - 7 - 3 0 5

[Address] Tokyo Hachioji City Sanda-machi 1 - 7 - 7 - 305

(71) 【出願人】

(71) [Applicant]

【識別番号】 0 0 0 1 8 2 4 3 2

[Applicant Code] 000182432

【氏名又は名称】 首藤 紘一

[Name] SHUDO KOICHI

【住所又は居所】 東京都目黒区東山 2 丁目 2 5 番 6 - 1 0 2 号 公務員宿舍

[Address] Tokyo Meguro-ku Higashiyama 2-Chome 25 turn 6 - 102 number government employee dormitory

(72) 【発明者】

【氏名】 実吉 泰郎

【住所又は居所】 東京都八王子市散田町 1-7-7-305

(72) 【発明者】

【氏名】 首藤 絃一

【住所又は居所】 東京都目黒区東山 2 丁目 2 5 番 6-102 号公務員宿舍

(74) 【代理人】

【弁理士】

(57) 【要約】

【構成】 2'-デオキシ-リボヌクレオシド 5'-トリリン酸、例えば 2'-デオキシ-リチミジン 5'-トリリン酸を有効成分として含む逆転写酵素阻害剤。

【効果】 レトロウイルス、例えば HIV の産生する逆転写酵素を強く阻害するので、エイズの治療や予防、ならびにエイズ・ウイルス感染後の発病抑制・遅延に有用である。また、生化学、遺伝子工学等の研究のために用いられる試薬としても有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 2'-デオキシ-リボヌクレオシド 5'-トリリン酸を有効成分として含む逆転写酵素阻害剤。

【請求項 2】 2'-デオキシ-リチミジン 5'-トリリン酸を有効成分として含む請求項 1 記載の逆転写酵素阻害剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、逆転写酵素阻害剤に関する。さらに詳しくは、本発明は、エイズウイルス（HIV：ヒト免疫不全ウイルス）等のレトロウイルスが産生する逆転写酵素を阻害し、後天性免疫不全症候群（AIDS、エイズ）の治療や感染後の発病抑制に有用な逆転写酵素阻害剤に関する。

(72) [Inventor]

[Name] Tsukasa Saneyoshi Mine

[Address] Tokyo Hachioji City Sanda-machi 1-7-7-305

(72) [Inventor]

[Name] Shudo Koichi

[Address] Tokyo Meguro-ku Higashiyama 2-Chome 25 turn 6-102 number government employee dormitory

(74) [Attorney(s) Representing All Applicants]

[Patent Attorney]

(57) [Abstract]

[Constitution] 2'-deoxy-L-ribo-nucleoside 5'-bird phosphoric acid, reverse transcriptase inhibitor which includes for example 2'-deoxy-L-thymidine 5'-bird phosphoric acid as the active ingredient.

[Effect] Because reverse transcriptase which retrovirus and for example HIV is produced is obstructed strongly, it is useful in treatment and prevention of AIDS, and the disease control \* delay after AIDS \* viral infection. In addition, it is useful as reagent which is used because of the biochemistry and genetic engineering or other research.

[Claim(s)]

[Claim 1] Reverse transcriptase inhibitor which includes 2'-deoxy-L-ribo-nucleoside 5'-bird phosphoric acid as active ingredient.

[Claim 2] Reverse transcriptase inhibitor which is stated in Claim 1 which includes 2'-deoxy-L-thymidine 5'-bird phosphoric acid as active ingredient.

[Description of the Invention]

[0001]

[Field of Industrial Application] This invention regards reverse transcriptase inhibitor. Furthermore as for details, as for this invention, it obstructs reverse transcriptase which AIDS virus (HIV: human immunodeficiency virus) or other retrovirus produces, regards useful reverse transcriptase inhibitor in treatment of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS, AIDS) and disease control after infection.

【従来の技術】従来、天然型ヌクレオシドの光学対掌体（エナンチオマー）である非天然型エナンチオヌクレオシドが種々合成されてきた。これらのうち、L型ヌクレオシドに属する3'-チア-2'-デオキシ-L-シチジン(3TC, Antimicrob. Agents Chemother., 36, 1688-1694, 1992) および3'-チア-2'-デオキシ-5-フルオロ-L-シチジン(FTC, Antimicrob. Agents Chemother., 36, 2423-2431, 1992) には強い抗HIV活性が報告されている。また、L-チミジンが、単純ヘルペスウイルス1型にコードされるチミジンキナーゼによってリン酸化され、感染細胞中におけるウイルスの複製を阻害することが報告されている(J. Med. Chem., 35, 4214-4220, 1992)。

【0002】

【発明が解決しようとする課題および課題を解決するための手段】本発明者は、2'-デオキシ-L-リボヌクレオシド 5'-トリリン酸を製造してその生物活性を検討したところ、この化合物がレトロウイルスの産生する逆転写酵素を強く阻害することを見出し、本発明を完成するに至った。本発明の逆転写酵素阻害剤は、特にHIVの産生する逆転写酵素を強く阻害するので、エイズの治療や予防、ならびにエイズ・ウイルス感染後の発病抑制・遅延に有用である。また、生化学、遺伝子工学等の研究のために用いられる試薬としても有用である。本発明の逆転写酵素阻害剤に有効成分として含まれる2'-デオキシ-L-リボヌクレオシド 5'-トリリン酸としては、例えば、2'-デオキシ-L-チミジン 5'-トリリン酸；2'-デオキシ-L-ウリジン 5'-トリリン酸；2'-デオキシ-L-アデノシン 5'-トリリン酸；2'-デオキシ-L-グアノシン 5'-トリリン酸；2'-デオキシ-L-シチジン 5'-トリリン酸等の天然型2'-デオキシリボヌクレオシド 5'-トリリン酸の光学対掌体、および2'-デオキシ-L-5-フルオロウリジン 5'-トリリン酸等の非天然型2'-デオキシリボヌクレオシド 5'-トリリン酸の光学対掌体を挙げることができる。

【0003】本発明の逆転写酵素阻害剤に有効成分として含まれる2'-デオキシ-L-リボヌクレオシド 5'-トリリン酸は、L-チミジン等のL-ヌクレオシド（天然型ヌクレオシドの光学対掌体）を、例えばオキシ塩化リン等により5'-モノリン酸化体とした後、例えばホスホロイミダゾリデート法によって対応する5'-トリリン酸化体とすることにより製造することができる。本発明の逆転写酵素阻害剤を、例えばHIVウイルス等のレトロウイルスの関与する疾患などの治療や予防、またはレトロウイルス感染後の発病抑制あるいは遅延のための医薬として用いることができる。この場合には、

[Prior Art] Unnatural type enantio nucleoside which until recently, is a optics opposite isomer (enantiomer) of natural nucleoside was synthesized various. Among these, strong anti-HIV activity is reported to 3'-thia-2'-deoxy-L-cytidine (3TC, Antimicrob. agents Chem other., 36, 1688-1694, 1992) and 3'-thia-2'-deoxy-5-fluoro-L-cytidine (FTC, Antimicrob. agents Chem other., 36, 2423-2431, 1992) which belong to the L shape nucleoside. In addition, L-thymidine, to phosphoric acid is converted by herpes simplex virus Type I with the thymidine kinase which cord is done, duplication of virus in the infected cell is obstructed is reported densely, (Journal of Medicinal Chemistry (0022-2623, JMC MAR), 35, 4214-4220, 1992).

[0002]

<means in order to solve Problems That Invention Seeks to Solve and problem>The this inventor, producing 2'-deoxy-L-ribo-nucleoside 5'-bird phosphoric acid, when it examined biological activity, obstructs reverse transcriptase which this compound produces retrovirus strongly densely to discover, this invention it reached to completion. Because reverse transcriptase inhibitor of this invention obstructs reverse transcriptase which the especially HIV is produced strongly, it is useful in treatment and prevention of the AIDS, and disease control \*delay after AIDS \*viral infection. In addition, it is useful as reagent which is used because of the biochemistry and genetic engineering or other research. In reverse transcriptase inhibitor of this invention for example 2'-deoxy-L-thymidine 5'-bird phosphoric acid; 2'-deoxy-L-uridine 5'-bird phosphoric acid; the 2'-deoxy-L-adenosine 5'-bird phosphoric acid; 2'-deoxy-L-guanosine 5'-bird phosphoric acid; optics opposite isomer of 2'-deoxy-L-cytidine 5'-bird phosphoric acid or other natural 2'-deoxyribo-nucleoside 5'-bird phosphoric acid, and optics opposite isomer of 2'-deoxy-L-5-fluoro uridine 5'-bird phosphoric acid or other unnatural type 2'-deoxyribo-nucleoside 5'-bird phosphoric acid can be listed as active ingredient as the 2'-deoxy-L-ribo-nucleoside 5'-bird phosphoric acid which is included.

[0003] It can produce 2'-deoxy-L-ribo-nucleoside 5'-bird phosphoric acid which is included in reverse transcriptase inhibitor of the this invention as active ingredient, after making 5'-mono phosphoric acid conversion body the L-thymidine or other L-nucleoside (optics opposite isomer of natural nucleoside), with for example phosphorus oxychloride etc, by making 5'-bird phosphoric acid conversion body which corresponds with for example phosphoro imidazo jp9 D jp7 method. You can use reverse transcriptase inhibitor of this invention, as pharmaceutical for disease control or the delay after disease or other treatment and prevention or retrovirus

上記の2'-デオキシ-リボヌクレオシド 5'-トリリン酸を有効成分として含む医薬組成物として患者に投与すればよい。医薬組成物としては、例えば、カプセル剤、錠剤、細粒剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等の経口投与用組成物、あるいは注射剤、坐剤、点眼剤、眼軟膏、点耳剤、または外皮用剤等の非経口投与用組成物を挙げることができる。これらの医薬用組成物は常法により製造できるが、必要により薬理的、製剤学的に許容しうる添加物を加えて製造してもよい。

【0004】経口剤及び坐剤の製造には、乳糖、D-マンニトール、トウモロコシデンプン、結晶セルロース等の賦形剤；カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム等の崩壊剤；ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン等の結合剤；ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤；ヒドロキシプロピルメチルセルロース、白糖、酸化チタン等のコーティング剤；又はポリエチレングリコール、ハードファット等の基剤を製剤用成分として使用すればよい。注射剤あるいは点眼、点耳剤の製造には、注射用蒸留水、生理食塩水、プロピレングリコール等の水性あるいは用時溶解型剤型を構成しうる溶解剤ないし溶解補助剤；無機又は有機の酸あるいは塩基のpH調節剤；食塩、ブドウ糖、グリセリン等の等張化剤；又は安定化剤等の製剤成分を使用すればよい。眼軟膏剤、外皮用剤の製造には、白色ワセリン、マクロゴール、グリセリン、綿布等の軟膏剤、クリーム剤、貼付剤に汎用される適切な製剤成分を使用すればよい。本発明の逆転写酵素阻害剤を医薬組成物として用いる場合には、例えば、成人の患者に対して、有効成分である2'-デオキシ-リボヌクレオシド 5'-トリリン酸の一日あたり投与量が0.1~1,000 mg/kg 程度となるように投与すればよいが、治療や予防の目的や患者の年齢や症状により適宜増減してもよい。

#### 【0005】

【実施例】以下、本発明の好ましい態様である2'-デオキシ-リボチミジン 5'-トリリン酸についてさらに具体的に説明するが、本発明はこの化合物およびこれらの実施例に限定されることはない。

例1：2'-デオキシ-リボチミジン 5'-トリリン

infection where for example HIV virus or other retrovirus participates. In this case, if it should have prescribed to patient as active ingredient the above-mentioned 2'-deoxy-L-ribonucleoside 5'-triphosphoric acid as pharmaceutical composition which it includes. As pharmaceutical composition, for example capsules, tablets, fine granule, granule, powder, the composition, or injectable, suppository, ophthalmic solution, eye ointment, eardrop for syrup or other oral dosage or composition for agent or other parenteral administration of epidermis can be listed. It can produce composition for these pharmaceutical with conventional method, it is possible to pharmacological and pharmaceutical to produce including acceptable additive, but in accordance with necessary.

[0004] If lactose, D-mannitol, cornstarch and crystalline cellulose or other excipient; carboxymethyl cellulose, calcium carboxymethyl cellulose or other disintegrating agent; the hydroxypropyl cellulose, hydroxypropyl methylcellulose and polyvinyl pyrrolidone or other binder; magnesium stearate and talc or other lubricant; hydroxypropyl methylcellulose, the sucrose and titanium dioxide or other coating agent; you should have used or polyethylene glycol and hard fat or other group agent to production of oral drug and suppository, as component for formulation. dissolver or solubilizer which if can form injectable distilled water, physiological saline, the propylene glycol or other aqueous or dissolve when used type agent form; acid of inorganic or organic or pH adjustment agent of base; the salt, fructose and glycerine or other isotonic agent; or stabilizer or other formulation component should have been used to production of injectable or eyedrop, eardrop. Appropriate formulation component which if is widely used in white vaseline, macrogol, the glycerine, cotton cloth or other ointment, cream agent and tackifier should have been used to production of eye ointment and agent for epidermis. When reverse transcriptase inhibitor of this invention it uses, as pharmaceutical composition in order for one's light dose of 2'-deoxy-L-ribonucleoside 5'-triphosphoric acid which is a active ingredient vis-a-vis the patient of for example adult, to become 0.1 to 1,000 mg/kg extent, if it should have prescribed, but it is possible to increase and decrease appropriately with the object of treatment and prevention and age and symptom of patient.

#### [0005]

[Working Example(s)] Furthermore you explain concretely below, concerning 2'-deoxy-L-thymidine 5'-triphosphoric acid which is an embodiment where this invention is desirable, but as for the this invention there is not this compound or times when it is limited in these Working Example.

Example 1: Production of 2'-deoxy-L-thymidine 5'-triphosphoric acid

## 酸の製造

Ｌ－チミジン 20 mg (0.083 ミリモル) をりん酸トリエチル 1 ml に溶解し、 $-10^{\circ}\text{C}$  に冷却した後、オキシ塩化りん 50  $\mu\text{l}$  を添加した。 $4^{\circ}\text{C}$  にて 16 時間反応させた後、反応液を 1 M 炭酸水素ナトリウム水溶液 2 ml に攪拌しながら注いだ。中和後、水を添加して全量を 50 ml に希釈した後、クロロホルム 10 ml で 3 回洗浄した。水層を DEAE－セルロース (3 cm I.D.  $\times$  7 cm, Whatman DE-52) に吸着させて水洗した後、トリエチルアンモニウムピカ－ボネートの直線濃度勾配 (0－0.3 M, 500 ml  $\times$  2) で溶出した。5'－モノりん酸を含むフラクションを集めて濃縮し、2'－デオキシ－Ｌ－チミジン 5'－モノりん酸 (L－dTMP) を得た。505 OD<sub>267</sub> (0.1 N HCl) 収率 63 %

[0006] 2'－デオキシ－Ｌ－チミジン 5'－モノりん酸 475 OD<sub>267</sub> をジメチルホルムアミドに溶解し、カルボニルジイミダゾール 40.5 mg を添加後、室温にて 3.5 時間攪拌した。メタノール 15.4 ml を添加して 30 分攪拌した後、ピロリン酸トリブチルアミン塩ジメチルホルムアミド溶液 (0.6 ミリモル/ml) 1 ml を添加し室温で 24 時間攪拌した。反応液を減圧乾固した後、残渣を水 50 ml に溶解して、活性炭 1 グラムを添加した。穏やかに 10 分間攪拌した後、残渣に水 50 ml を添加して溶解した。この溶液を DEAE－セルロース (3 cm I.D.  $\times$  7 cm, Whatman DE-52) に吸着させて水洗した後、トリエチルアンモニウムピカ－ボネートの直線濃度勾配 (0－0.5 M, 500 ml  $\times$  2) で溶出した。5'－トリりん酸を含むフラクションを集めて濃縮し、2'－デオキシ－Ｌ－チミジン 5'－トリりん酸 (L－dTTP) を得た。370 OD<sub>267</sub> (0.1 N HCl) 収率 78 %

UV 吸収スペクトル:  $\lambda$  max 267 nm ( $\text{H}_2\text{O}$ )

りん原子含量: 計算値  $\epsilon$  (p) 267 nm ( $\text{H}_2\text{O}$ ) = 3,200

実測値  $\epsilon$  (p) = 2,900

HPLC 分析: 保持時間 6.8 分 純度 97 %

カラム YMC ODS A-302 逆相樹脂、水－アセトニトリルおよび 1 M トリエチルアンモニウムアセテート緩衝液 (pH 7.0) (78:2:20, v/v/v)、流速 1 ml/分、 $50^{\circ}\text{C}$ 。

## [0007] 例 2: 試験例

上記の 2'－デオキシ－Ｌ－チミジン 5'－トリりん酸 (L－dTTP) を用いて真核生物およびウイルスの

## phosphoric acid

L-thymidine 20 mg (0.083 millimole) was melted in triethyl phosphite 1 ml, after cooling in  $-10^{\circ}\text{C}$ , the phosphorus oxychloride 50  $\mu\text{l}$  was added. While with  $4^{\circ}\text{C}$  after 16-hour reaction, agitating reaction mixture to the 1 M sodium bicarbonate water solution 2 ml, you poured. After neutralizing, adding water, after diluting total amount in the 50 ml, thrice you washed with chloroform 10 ml. After adsorbing into DEAE-cellulose (3 cm I.D.  $\times$  7 cm, Whatman DE-52), water wash doing water layer, it liquated with linear concentration gradient (0-0.3 M, 500 ml  $\times$  2) of triethyl ammonium bicarbonate. Gathering fraction which includes 5'-mono phosphoric acid, it concentrated, acquired 2'-deoxy-L-thymidine 5'-mono phosphoric acid (L-dTMP). 505 OD<sub>267</sub> (0.1 N HCl) yield 63 %

[0006] 2'-deoxy-L-thymidine 5'-mono phosphoric acid 475 OD<sub>267</sub> was melted in dimethylformamide, carbonyl diimidazole 40.5 mg after adding the 3.5 hours was agitated with room temperature. Adding methanol 15.4 ml, 30 min after agitating, it added pyrophosphoric acid tributyl amine salt dimethylformamide solution (0.6 millimole/ml) 1 ml and the 24 hours agitated with room temperature. vacuum dry solid after doing reaction mixture, melting residue in water 50 ml, it added activated carbon 1 gram. Calmly 10 min after agitating, it filtered, added water 50 ml to residue and melted. After adsorbing into DEAE-cellulose (3 cm I.D.  $\times$  7 cm, Whatman DE-52), water wash doing this solution, it liquated with linear concentration gradient (0-0.5 M, 500 ml  $\times$  2) of triethyl ammonium bicarbonate. Gathering fraction which includes 5'-tri phosphoric acid, it concentrated, acquired 2'-deoxy-L-thymidine 5'-tri phosphoric acid (L-dTTP). 370 OD<sub>267</sub> (0.1 N HCl) yield 78 %

UV absorption spectrum: max 267 nm ( $\text{H}_2\text{O}$ )

Phosphorus atom content: Calculated value (p) 267 nm ( $\text{H}_2\text{O}$ ) = 3,200

Actual measured value (p) = 2,900

HPLC analysis: Hold time 6.8 min purity 97 %

Column YMC ODS A-302 reverse phase resin, water-acetonitrile and 1 M triethyl ammonium acetate buffer (pH 7.0) (78:2:20, v/v/v), flow rate 1 ml per minute and  $50^{\circ}\text{C}$ .

## [0007] Example 2: Test Example

Action for DNA polymerase of eukaryote and virus making use of the above-mentioned 2'-deoxy-L-thymidine 5'-bird

DNAポリメラーゼに対する作用を検討した。ポリメラーゼとしては、コウシ胸腺DNAポリメラーゼ $\alpha$  (Pol  $\alpha$ )、ラットDNAポリメラーゼ $\beta$  (Pol  $\beta$ : Date, T., et al., Biochemistry, 27, 2983-2990, 1988)、ウシ肝臓DNAポリメラーゼ $\gamma$  (Pol  $\gamma$ : Izuta, S., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 179, 776-783, 1991)、およびHIV-1由来のレトロウイルス逆転写酵素(HIV-1 RT)を用いた。DNAポリメラーゼ $\beta$ とレトロウイルス逆転写酵素は、遺伝子組換えにより大腸菌で生産、精製された酵素である。酵素活性測定は、以下の表1に示す条件を用い、各ポリメラーゼを37°Cで20分間インキュベートした後、反応液を冷却してDE 81イオン交換紙に吸着させ、5%Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>で6回、つづいて水で2回洗浄した後、イオン交換紙を乾燥して放射活性を測定することにより行った。

[0008]

[表1]

$\beta$	Pol $\gamma$	HIV-1 RT	Pol $\alpha$	Pol
50 mM Tris-HCl .8		pH8.3	pH7.5	pH8
40 mM KPi pH7.5				
MnCl <sub>2</sub> mM	0.5 mM	0.5 mM		0.5
MgCl <sub>2</sub>			4 mM	
DTT M	1 mM	1 mM	1 mM	1 m
BSA $\mu$ g/ml	400 $\mu$ g/ml	100 $\mu$ g/ml	400 $\mu$ g/ml	400
KCl mM	50 mM	50 mM		100
ポリ[rA] g/ml	40 $\mu$ g/ml	20 $\mu$ g/ml		40 $\mu$
オリゴ[dT] g/ml	10 $\mu$ g/ml	10 $\mu$ g/ml		40 $\mu$

phosphoric acid (L - dTTP) was examined. As polymerase, retrovirus reverse transcriptase (HIV-1 RT) of calf thymus DNA polymerase (Pol ), rat DNA polymerase (Pol :Date, T., et al., Biochemistry (0006-2960, BICHAW), 27, 2983-2990, 1988), bovine liver DNA polymerase (Pol :Izuta, S., et al., Biochemical and Biophysical Research Communications (0006-291X, BBRCA), 179, 776-783, 1991), and HIV - 1 derivation was used. With E. coli it was produced and it is a enzyme which was refined the DNA polymerase and retrovirus reverse transcriptase, by gene recombination. Each polymerase 20-minute incubate after doing, cooling reaction mixture with 37 °Cmaking use of condition which is shown in Table 1,below ,adsorbing into DE 81 ion exchange paper, 6 time, continuing with 5%Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,the twice after washing with water, drying ion exchange paper it did the enzyme activity measurement, by measuring radioactivity.

[0008]

[Table 1]

HIV-1 R TP ol	Pol	Pol	Pol
50 mM Tris- HCl	pH 8.3	pH 7.5	pH 8.8
40 mM KPi			pH 7.5
Mn Cl <sub>2</sub>	0.5 mM	0.5 mM	0.5 mM
MgCl <sub>2</sub>	4 mM		
DTT	1 mM	1 mM	1 mM
BSA	100 g/ml	400 g/ml	400 g/ml
KCl	50 mM	100 mM	50 mM
Poly [rA]	20 g/ml	40 g/ml	40 g/ml
Oligo [dT]	10 g/ml	40 g/ml	10 g/ml

活性化DNA	100 $\mu$ g/ml		
[ <sup>3</sup> H]dTTP	50 $\mu$ M	50 $\mu$ M	50 $\mu$ M
M	50 $\mu$ M		
dATP		100 $\mu$ M	
dCTP		100 $\mu$ M	
dGTP		100 $\mu$ M	
酵素量 (ユニット)	0.1-0.6	0.1-0.6	0.1-0.6
	0.1-0.6		

【0009】上記の各DNAポリメラーゼに対する2'-デオキシ-5'-トリリン酸(L-dTTP)の作用を50  $\mu$ M dTTP存在下で検討した。対照として、抗HIV剤として周知の3'-アジド-3'-デオキシチミジン(AZT)の5'-トリリン酸化体(AZT-TP: Ono, K., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 140, 498-507, 1986)および $\alpha$ -dTTP (Yamaguchi, T., et al., Chem. Pharm. Bull., 32, 1441-1450, 1984)を用いた。Pol  $\alpha$ の鋳型プライマーとして活性化DNAを用いた場合、L-dTTPによる阻害効果はほとんど認められず、Pol  $\beta$ に対しても、ポリ[rA]-オリゴ[dT]を鋳型プライマーとして用いた場合には、わずかな阻害が認められるにすぎなかった。一方、Pol  $\gamma$ に対しては、L-dTTPによる阻害効果が認められたが、AZT-TPと比較すると、その阻害活性はやや低かった。また、 $\alpha$ -dTTPはPol  $\gamma$ に対して弱い阻害作用を示した。レトロウイルス逆転写酵素の活性測定に頻用されるポリ[rA]-オリゴ[dT]を鋳型プライマーとして用いると、L-dTTPはHIV-1 RTに対して強い阻害作用を示した。結果を図1ないし図4に示す。図4に示されたL-dTTPのHIV-1 RTに対する阻害効果について、ラインウィーバー-バーク・プロットで酵素阻害様式を検討したところ、L-dTTPは基質であるdTTPと拮抗阻害することが示された。HIV-1 RTに対するL-dTTPの $K_i/K_m$ 値は0.07であり、L-dTTPはHIV-1 RTに対して、基質のdTTPよりも約14倍高い親和性を示した。

## 【0010】

【発明の効果】本発明の逆転写酵素阻害剤は、特にHIVの産生する逆転写酵素を強く阻害するので、エイズの治療や感染後の発病抑制・遅延に有用である。また、生化学、遺伝子工学等の研究のために用いられる試薬としても有用である。

Activated DNA	100 g/ml			
[ <sup>3</sup> H] DTTP	50 M	50 M	50 M	50 M
M				
DATP		100 M		
DCTP		100 M		
DGTP		100 M		
Amount of enzyme (unit)	0.1-0.6	0.1-0.6	0.1-0.6	0.1-0.6

[0009] Action of 2'-deoxy-L-thymidine 5'-triphosphoric acid (L-dTTP) for above-mentioned each DNA polymerase was examined under 50 M dTTP existing. 5'-triphosphoric acid conversion body (AZT-TP: Ono, K., et al., Biochemical and Biophysical Research Communications (0006-291X, BBRCA), 140, 498-507, 1986) and -dTTP (Yamaguchi, T., et al., Chemical & Pharmaceutical Bulletin (0009-2363, CPBTAL), 32, 1441-1450, 1984) of widely known 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) were used as contrast, as anti-HIV drug. When activated DNA is used as template primer of Pol, it cannot recognize inhibiting effect for most part with L-dTTP, it uses vis-a-vis Pol, when poly[rA]-oligo[dT], as template primer it only can recognize little obstruction. But on one hand, it could recognize inhibiting effect with L-dTTP, vis-a-vis Pol, when it compares with AZT-TP, inhibitory activity was a little low. In addition, -dTTP showed weak inhibition vis-a-vis Pol. When it uses poly[rA]-oligo[dT] which frequently business is done for activity measurement of the retrovirus reverse transcriptase, as template primer L-dTTP showed strong inhibition vis-a-vis the HIV-1 RT. result is shown in Figure 1 through Figure 4. When enzyme obstruction style was examined with line Weibull-Berk \* plot concerning inhibiting effect for HIV-1 RT of L-dTTP which is shown in the Figure 4, dTTP and competitive inhibition which are a substrate it does L-dTTP, it was shown densely. As for  $K_i/K_m$ -value of L-dTTP for HIV-1 RT with 0.07, as for the L-dTTP approximately 14-fold high affinity was shown vis-a-vis the HIV-1 RT, in comparison with dTTP of substrate.

## 【0010】

[Effects of the Invention] Because reverse transcriptase inhibitor of this invention obstructs reverse transcriptase which the especially HIV is produced strongly, it is useful in treatment of the AIDS and disease control \* delay after infection. In addition, it is useful as reagent which is used because of the biochemistry and genetic engineering or other research.

## 【図面の簡単な説明】

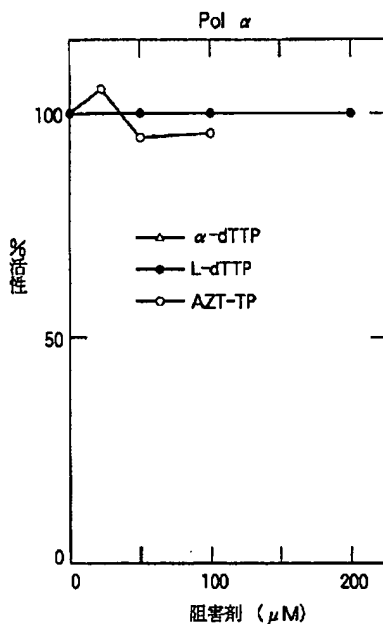
【図 1】 コウシ胸腺DNAポリメラーゼ $\alpha$  (Pol  $\alpha$ ) に対する本発明の逆転写酵素阻害剤の効果を示した図である。

【図 2】 ラットDNAポリメラーゼ $\beta$ に対する本発明の逆転写酵素阻害剤の効果を示した図である。

【図 3】 ウシ肝臓DNAポリメラーゼ $\gamma$ に対する本発明の逆転写酵素阻害剤の効果を示した図である。

【図 4】 HIV-1 由来のレトロウイルス逆転写酵素 (HIV-1 RT) に対する本発明の逆転写酵素阻害剤の効果を示した図である。

【図 1】



## [Brief Explanation of the Drawing(s)]

[Figure 1] It is a figure which shows effect of reverse transcriptase inhibitor of this invention for the calf thymus DNA polymerase (Pol ).

[Figure 2] It is a figure which shows effect of reverse transcriptase inhibitor of this invention for the rat DNA polymerase .

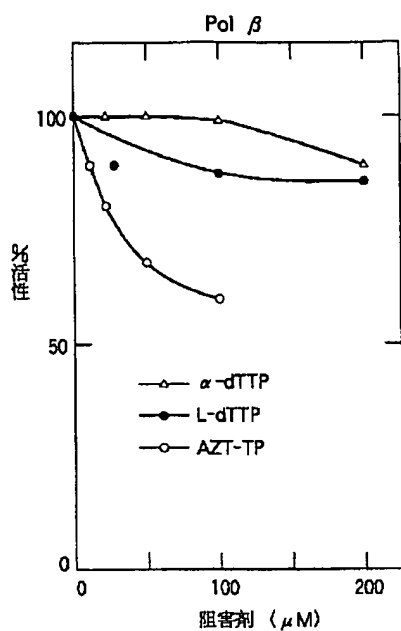
[Figure 3] It is a figure which shows effect of reverse transcriptase inhibitor of this invention for the bovine liver DNA polymerase .

[Figure 4] It is a figure which shows effect of reverse transcriptase inhibitor of this invention for the retrovirus reverse transcriptase (HIV-1 RT) of HIV - 1 derivation.

[Figure 1]

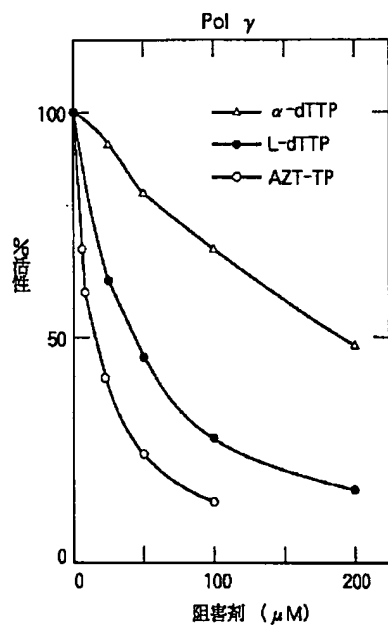


【図 2】

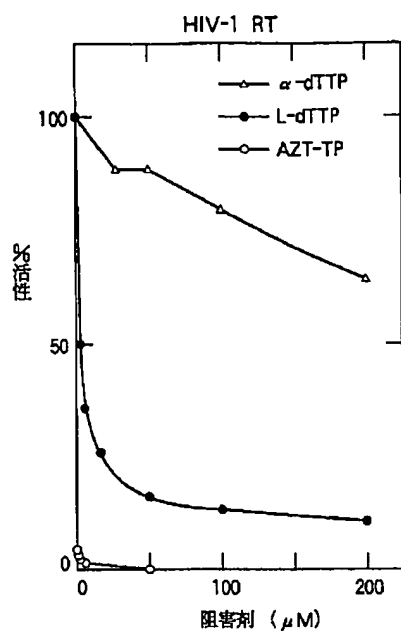


[Figure 2]

【図 3】



[Figure 3]



【図 4】

[Figure 4]